

- における役割. 第 49 回日本腎臓学会学術総会、新宿、平成 18 年 6 月 15 日
17. Chairoungdua A, Sangwung P, Kanai Y: Role of C-terminus of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in membrane targeting、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、Kyoto、Japan、Jun. 19, 2006
 18. Promchan K, Chairoungdua A, Ueno T, Kanai Y: Identification of the CD98hc interacting protein by proteomic approach、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、Kyoto、Japan、Jun. 19, 2006
 19. Anzai N, Khamdang S, Kim DK, Kanai Y, Endou H: Identification of the intracellular binding protein with T-type amino acid transporter TAT1 using the yeast two-hybrid screening、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、Kyoto、Japan、Jun. 19, 2006
 20. Ueno T, Chairoungdua A, Kongsophol P, Kanai Y: Identification of intracellular amino acid signaling using proteomic approach、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、Kyoto、Japan、平成 18 年 6 月 19 日
 21. Tokunaga M, Washio N, Matsuo H, Ishimine H, Tsukada S, Kanai Y, Nishikawa S, Kazama T, Kobayashi Y, Fukuda J: Immunohistochemical analysis of serine transporters in the rodent brains、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、Kyoto、Japan、Jun. 19, 2006
 22. Hirata T, Babu E, Nimitvilai S, Nomura K, Mitani S, Andou K, Kanai Y: Analysis of *C. elegans* SLC7 amino acid transporters、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、Kyoto、Japan、Jun. 19, 2006
 23. Noonin C, Jutabha P, Piyachaturawat P, Kanai Y: Transport of methyl mercury-cysteine conjugate in T24 human bladder carcinoma cells by L-type amino acid transporter、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、Kyoto、Japan、Jun. 19, 2006
 24. Li Y, Kanai-Azuma M, Hirata T, Anzai N, Kawakami H, Endou H, Kanai Y: Identification of a novel cationic amino acid transporter CAT5 specifically expressed in placenta、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB

- Congress, Kyoto, Japan, Jun. 19, 2006
25. Phetdee K, Hirata T, Babu E, Shiraya K, Anzai N, Endou H, Kanai Y: Identification and characterization of a novel organic anion transporter (OAT9), 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, Jun. 19, 2006
 26. Jutabha P, Noonin C, Anzai N, Kanai Y: Type I sodium-phosphate cotransporter functions as a voltage-driven organic anion transporter in human, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, Jun. 19, 2006
 27. He X, Anzai N, Hirata T, Endou H, Kanai Y : Tissue distribution and localization of IKEPP/NHERF4 of a member of the NHERF gene family, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, Jun. 19, 2006
 28. Anzai N, Khamdang S, Kim DK, Kanai Y, Endou H: Identification of the intracellular binding protein with T-type amino acid transporter TAT1 using yeast two-hybrid screening, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, Jun. 19, 2006
 29. Endou H, Anzai N: Involvement of transporters in nephrotoxicity. IUPHAR 2006, Symposium S3 “Transporters and Adverse Effects of Drugs”, 15th World Congress of Pharmacology (IUPHAR), Beijing, China, Jul. 2, 2006 平成 18 年 7 月 2 日
 30. Jutabha P, 武藤朋子, 遠藤 仁, 金井好克 : セファロリジンのトランスポーター介在毒性の DNA マイクロアレイによる解析, 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成 18 年 7 月 3-5 日
 31. 武藤朋子, 金井好克, 和久井信, 遠藤 仁 : ヒト膀胱癌細胞 T24 における遺伝子発現のマイクロアレイ解析, 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成 18 年 7 月 3-5 日
 32. Rafiqul I, Jutabha P, 平田 拓, 安西尚彦, 遠藤 仁, 金井好克 : 上皮型アミノ酸輸送体 B⁰ を介するメチル水銀の輸送特性, 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成 18 年 7 月 3-5 日
 33. Ueno T, Chairoungdua A, Kongsophol P, Kanai Y: Explore branch chain amino acids induce intracellular signaling by proteomic approach, The 20th Annual Symposium of Protein Society, California, U.S.A., Jul. 19-23, 2006.

34. 安西尚彦、平田 拓、金井好克：Na⁺依存性乳酸輸送の腎尿酸再吸収機構における役割、財団法人ソルトサイエンス研究財団、第 18 回平成 17 年度助成研究発表会、東京、平成 18 年 7 月 25 日
35. 金井好克、安西尚彦、平田拓、Chairoungdua A：哺乳類ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの細胞膜移行を規定する因子—糖鎖の関与を含めて、第 3 回糖鎖の生物機能に関する研究会、東京、平成 18 年 8 月 30 日
36. 平田 拓、安西尚彦、金井好克：線虫 *C. elegans* の糖鎖関連トランスポーターおよびアミノ酸トランスポーターの解析、第 3 回糖鎖の生物機能に関する研究会、東京、平成 18 年 8 月 30 日
37. 平田 拓、何 新、Babu E、Phetdee K、Srivastava S、安西尚彦、石川貴正、曾我朋義、遠藤 仁、金井好克：新規有機イオントランスポーターサブファミリーの同定とその遺伝子ノックアウトマウスのメタボローム解析による生理機能の検討、第 12 回分子腎臓研究会、東京、平成 18 年 9 月 2, 3 日
38. Kanai Y: Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. 12th International Federation of Placenta Associations Meeting, Kobe, Japan, Sep 7, 2006.
39. Kanai Y, Chairoungdua A, Ueno T, Promchan K, Hirata T, Anzai N and Endou H: Amino acid transporters in cancer: A target for anti-cancer therapy. The 18th Korea-Japan joint seminar on Pharmacology, Fukui, Japan, Sep 24, 2006.
40. Anzai N, Noshiro R, Miyazaki H, Terada T, Inui K, Kanai Y, Endou H: Identification of the intracellular binding protein with oligopeptide transporter PEPT2 using yeast two-hybrid assay, The 18th Korea-Japan joint seminar on Pharmacology, Fukui, Japan, Sep 24, 2006.
41. 金井好克：輸送体を介するメチル水銀の吸収、体内動態、及び排泄の分子機構、平成 18 年度重金属等の健康影響に関する総合研究発表会、東京、平成 18 年 10 月 5 日
42. 金井好克:輸送分子複合体、東京大学大学院薬学系研究科講演、東京、平成 18 年 10 月 6 日
43. 何 新、平田 拓、Babu E、Phetdee K、Promchan K、Srivastava S、安西尚彦、石川貴正、曾我朋義、遠藤 仁、金井好克：新規有機イオントランスポーターの同定とその遺伝子ノックアウトマウスのメタボローム解析による生理機能の検討、第 115 回日本薬理学会関東部会、高崎、平成 18 年 9 月 29 日
44. Jurabha P、武藤朋子、Noonin C、Phetdee K、Promchan K、Srivastava S、遠藤 仁、金井好克：セファロリジンのトランス

- ポーターを介する毒性発現機序の DNA マイクロアレイによる解析、第 115 回日本薬理学会関東部会、高崎、平成 18 年 9 月 29 日
45. 上野剛、福富俊之、木村徹、平田拓、安西尚彦、金井好克: 輸送分子複合体解析を目指したプロテオミクス技術. 特定領域「生体膜トランスポートソームの分子機構と生理機能」平成 18 年度第 1 回班会議、宮城、平成 18 年 9 月 27-29 日
 46. 平田 拓、金井好克 : *C. elegans* を用いたトランスポートソームの解析: 特定領域「生体膜トランスポートソームの分子機構と生理機能」平成 18 年度第 1 回班会議、宮城、平成 18 年 9 月 27-29 日
 47. 金井好克、安西尚彦、平田拓、上野剛、木村徹、福富俊之 : 有機溶質トランスポートソーム : その構築と機能的意義. 特定領域「生体膜トランスポートソームの分子機構と生理機能」平成 18 年度第 1 回班会議、宮城、平成 18 年 9 月 27-29 日
 48. 安西尚彦、金井好克 (ポスター) : 酵母 Two-hybrid 法を用いたチャンネル・トランスポーター結合蛋白質の同定、文科省科研費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 18 年度第 1 回班会議、松島、平成 18 年 9 月 27-29 日
 49. Ueno T, Chairoungdua A, Kongsophol P, Kanai Y: A proteomic approach for clarification of an intracellular amino acid sensor system in upstream of mTOR pathway. 6th congress of FAOPS, Seoul, Korea, Oct. 16, 2006
 50. Anzai N, Miyauchi S, Endou H, Kanai Y: Identification of the multivalent PDZ domain protein PDZK1 as a binding partner of sodium-coupled monocarboxylate cotransporter 1 (SMCT1). 6th congress of FAOPS, Seoul, Korea, Oct. 16, 2006
 51. Hirata T, Shiraya K, Anzai N, Hatano R, Sanada S, Matsubara M, Muto S, Endou H, Kanai Y : Characterization of a novel prostaglandin-specific organic anion transporter (OAT-PG). 6th congress of FAOPS, Seoul, Korea, Oct. 16, 2006
 52. 安西尚彦 : Hartnup 病原因遺伝子 B⁰AT1 の上皮頂上膜移行を制御する結合蛋白質の解析、第 37 回病態代謝研究会研究報告会、東京、平成 18 年 10 月 21 日
 53. 平田 拓、何 新、安西尚彦、金井好克 : メタボローム技術を用いた新しいサブファミリーに属する新規有機イオントランスポーターの生理機能の解析、第 35 回杏林医学会総会、三鷹、平成 18 年 11 月 18 日
 54. 福富俊之、安西尚彦、上野 剛、木村徹、金井好克 : FRET 現象を用いた

- PDZK1-膜輸送分子複合体の解明、第 35 回杏林医学会総会、三鷹、平成 18 年 11 月 18 日
55. Rafiqul I, 何 新、安西尚彦、金井好克：上皮型アミノ酸輸送系 B⁰ を介するメチル水銀輸送についての検討、第 35 回杏林医学会総会、三鷹、平成 18 年 11 月 18 日
56. Li Y, 金井正美、川上速人、金井好克：アミノ酸トランスポーターLAT1 ノックアウトマウスの解析、第 35 回杏林医学会総会、三鷹、平成 18 年 11 月 18 日
57. 安西尚彦、金井好克：腎尿細管プロスタグランジン・シグナル機構を構成する輸送分子複合体の解明、第 35 回杏林医学会総会 平成 18 年度杏林大学医学部研究奨励賞中間発表、三鷹、平成 18 年 11 月 18 日
58. 金井好克：アミノ酸及び有機酸のトランスポーター：分子機能と創薬標的としての意義、金沢大学大学院薬学研究科特別講演、金沢、平成 18 年 11 月 24 日
59. 安西尚彦：尿酸トランスポーターURAT1 とマルチバレント PDZ タンパク質 PDZK1 との相互作用におけるリガンド認識のリン酸化による制御、第 32 回日本応用酵素協会研究発表会、大阪、平成 18 年 11 月 27 日
60. Kanai Y: Special lecture: Transporters for amino acids and organic anions: relevance to cellular physiology and pathophysiology. Seminar on CNS Amino Acid Transporters of the Biotechnology Centre of Oslo, Oslo, Norway, Nov 28, 2006.
61. 安西尚彦、何 新、金井好克、遠藤 仁：ヒト有機アニオントランスポーターhOAT2 によるニコチン酸輸送とサリチル酸との相互作用、第 27 回日本臨床薬理学会年会、新宿、平成 18 年 12 月 1 日
62. 安西尚彦、坂田 武、成川新一、三浦大作、遠藤 仁、金井好克：有機カチオントランスポーター OCT3 (SLC22A3) の遺伝子多型 (SNPs) と輸送機能解析、第 4 回日本予防医学学会学術総会、大宮、平成 18 年 12 月 2 日
63. 平田 拓：メタボローム技術を用いたオルファントランスポーターの生理機能の解析、第 90 回東京腎生理集談会、東京、平成 18 年 12 月 3 日
64. 坂田 武、安西尚彦、大津尚子、成川新一、金井好克、遠藤 仁：アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた腎臓薬物排出機構の代替法開発、第回日本動物代替法学会、東京、平成 18 年 12 月 8,9 日
65. Jutabha P, Muto T, Endou H, Kanai Y: Early response of gene expression to OAT3-mediated Cephaloridine toxicity assessed by DNA microarray analysis, The American Society for Cell Biology 46th

- Annual Meeting, San Diego, U.S.A., Dec. 11, 2006
66. Hirata T, Babu E, He X, Ishikawa T, Soga T, Anzai N, Endou H, Kanai Y: Molecular identification and functional characterization of a novel organic anion transporter OATN1, The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting, San Diego, U.S.A., Dec. 12, 2006
67. 安西尚彦、金井好克、遠藤 仁：腎尿細管上皮における有機溶質トランスポーター輸送活性化因子の探索、生理学研究所研究会「上皮膜輸送活性化因子を探して：宿主防御バリアーの最前線」、岡崎、平成 18 年 12 月 12-13 日
68. 金井好克：特定領域研究トランスポーターソーム、第 1 回トランスポーター研究会特別講演、東京、平成 18 年 12 月 16 日
69. 何 新、平田 拓、Ellapan Babu、安西尚彦、石川貴正、曾我朋義、遠藤 仁、金井好克（：オルファントランスポーター遺伝子 OATN1 ノックアウトマウスのメタボローム解析による輸送基質の解明、第 1 回トランスポーター研究会、東京、平成 18 年 12 月 16 日
70. 中川華月、平田 拓、Promsuk Jutabha、安西尚彦、原田浩二、井上佳代子、金井好克、小泉昭夫：Perfluorooctanoate (PFOA)の尿中排泄における OATs の役割、第 1 回トランスポーター研究会、東京、平成 18 年 12 月 16 日
71. 安西尚彦：トランスポーター結合蛋白質の同定、第 1 回トランスポーター研究会 シンポジウム 3 トランスポーター最近の話題、東京、平成 18 年 12 月 17 日
72. 金井好克：有機溶質トランスポーターソーム：その構築と機能的意義、特定領域研究「膜輸送複合体」平成 18 年度第 2 回班会議、東京、平成 19 年 1 月 12 日
73. Kanai Y, Anzai N, Hirata T, Ueno T, Kimura T, Fukutomi T, Chairougdou A: Heterodimeric amino acid transporters: protein-protein interactions for membrane targeting and cellular signaling, Joint International Symposium: Membrane Transport as a Universal Biological Mechanism, Kyoto, Japan, Jan 13, 2007
74. 金井好克：トランスポーターと創薬、岡山大学医学部特別講演、岡山、平成 19 年 1 月 26 日
75. 安西尚彦、金井好克（シンポジウム）：腎尿細管 PDZ タンパク質による尿酸輸送分子複合体形成、特定領域研究「膜輸送複合体」第 1 回若手ワークショップ シンポジウム 2 「生体膜トランスポーターソーム」、富士、平成 19 年 1 月 28 日
76. 金井好克：ある日のラボでのディスカッションから始まって、特定領域研究

- 「膜輸送複合体」第1回若手ワークショップナイトレクチャー, 富士, 平成19年1月28日
77. 何 新、平田 拓、Babu E、安西尚彦、石川貴正、曾我朋義、遠藤 仁、金井好克: オルファントランスポーター遺伝子 OATN1 ノックアウトのメタボローム解析による輸送基質の解明、特定領域研究「膜輸送複合体」第1回若手ワークショップ, 富士, 平成19年1月29日
78. Li Y、金井正美、川上速人、金井好克: Characterization of LAT1 knockout mice、特定領域研究「膜輸送複合体」第1回若手ワークショップ, 富士, 平成19年1月29日
79. 安西尚彦: トランスポーター結合タンパク質の同定から輸送機能複合体へ、第30回新潟腎カンファレンス、新潟、平成19年2月8日
80. 安西尚彦、何 新、金井好克: PDZK1 を介した Na^+ -モノカルボン酸共輸送体 SMCT1 と尿酸トランスポーターURAT1 の輸送分子複合体形成の可能性、第41回日本痛風・核酸代謝学会総会、新宿、平成19年2月15日
81. 安西尚彦、加国雅和、大房 健、吉里勝利、遠藤 仁: ヒト肝臓キメラマウスにおける血中ヒトアルブミン値と血清尿酸値の相関性に関する検討、第41回日本痛風・核酸代謝学会総会、新宿、平成19年2月15日
82. 金井好克: 尿酸と有機アニオンのトランスポーター: 最近の進展、第40回日本痛風・核酸代謝学会総会シンポジウム「痛風と核酸代謝のトピックス」、東京、2003年2月16日.
83. Kanai Y: Interaction of organic anion transporters with PDZ proteins. *The 10th Membrane Research Forum*, Kyoto, Japan, Feb 28, 2007.
84. Kanai Y: Post-genome perspective of SLC22 drug transporter family: metabolomics, polymorphism and transportsome. *The 4th International Symposium on Pharmacogenomics: Step Toward Personalized Medicine*, Seoul, Korea, Mar. 9, 2007.
85. 金井好克: 有機アニオントランスポーター: 腎尿細管上皮輸送における新たな展開、第84回日本生理学会大会シンポジウム「アニオン生理学の新展開: 輸送の分子メカニズムからアニオン介在型細胞内シグナル系まで」、大阪、2007年3月21日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予知を含む。) 該当無し。

Nephrotoxicity of cephaloridine

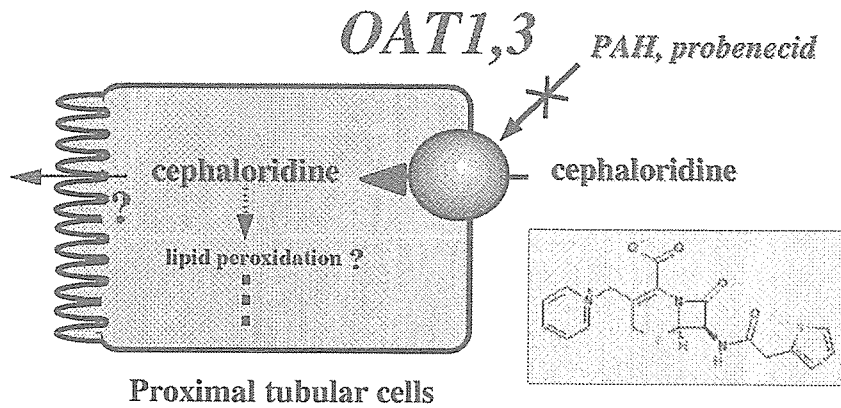


図1. 腎近位尿細管細胞へのセファロリジンの蓄積。セファロリジンは、血管側の有機アニオントランスポーターOAT1あるいはOAT3を介して病細管細胞内に入り、毒性を発揮する。

Strategy used for identification of gene expression changes mediated by transporter

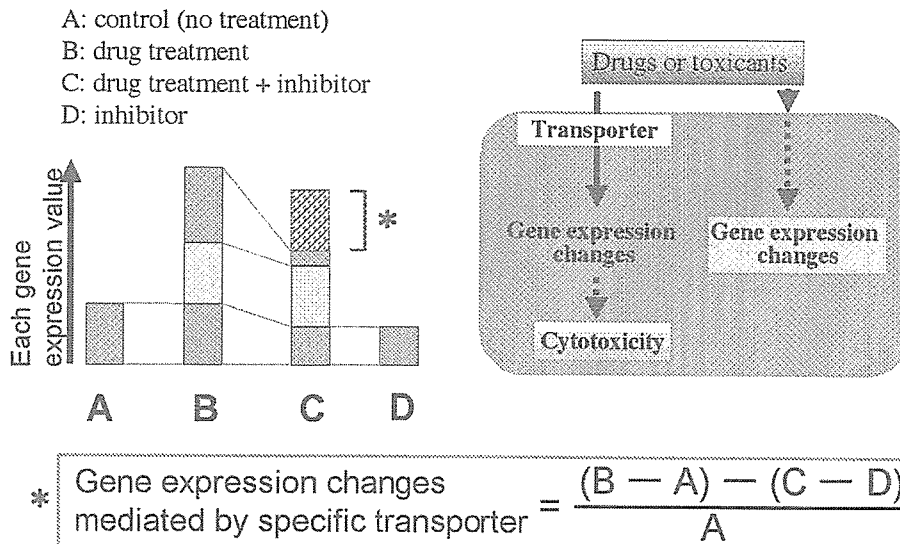


図2. トランスポーター介在毒性の細胞内機序のマイクロアレイによる解析。図の * 印に相当する部分の遺伝子発現変動を图中的数式により算出し、トランスポーター介在毒性に関わる遺伝子発現変動として評価する。

Rescue of Cephaloridine-induced cell death by probenecid

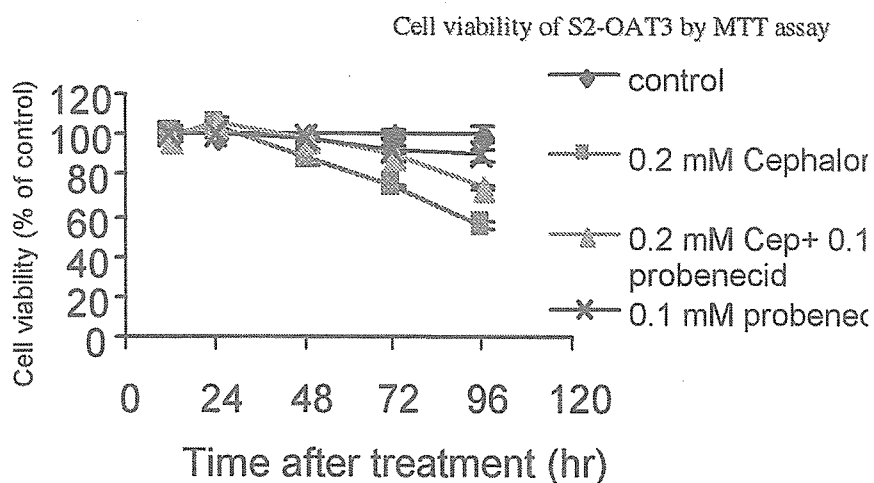


図3. セファロリジンのトランスポーター介在毒性。有機アニオントランスポーターOAT3を安定発現させたマウス腎尿細管由来S2細胞を0.2mMセファロリジンで処理し、その毒性をMTTアッセイにより評価した。さらにその毒性に対するOAT3インヒビターProbenecidの効果を検討した。

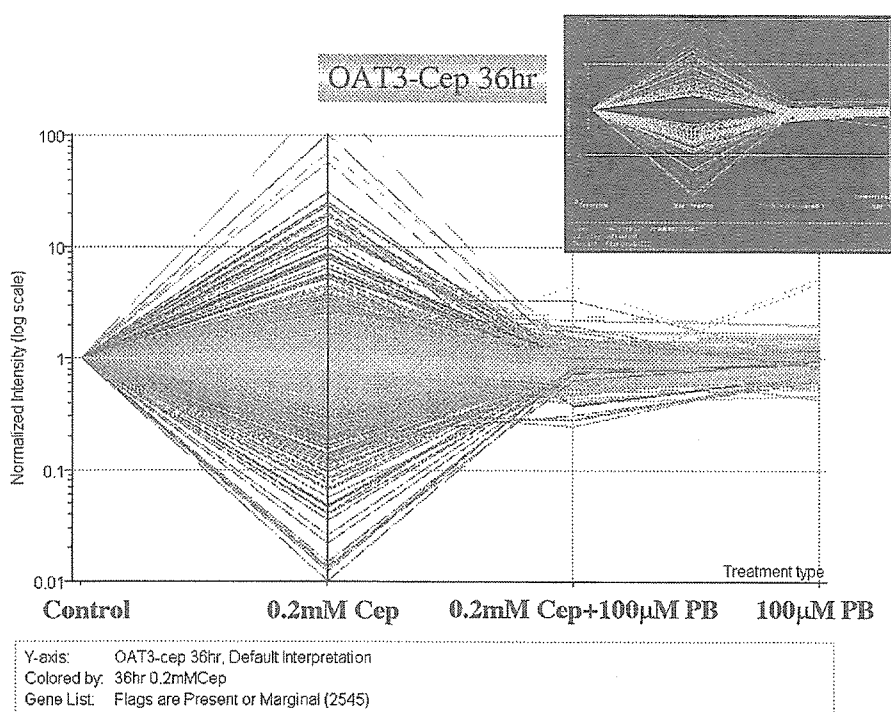


図4. セファロリジンのトランスポーター介在毒性のマイクロアレイ解析。0.2mM セファロリジン、36時間処理による有機アニオントランスポーターOAT3安定発現の遺伝子発現変動。Probenecidによりセファロリジンによる遺伝子発現変動が抑制さて、トランスポーター介在毒性を検出していることが確認される。

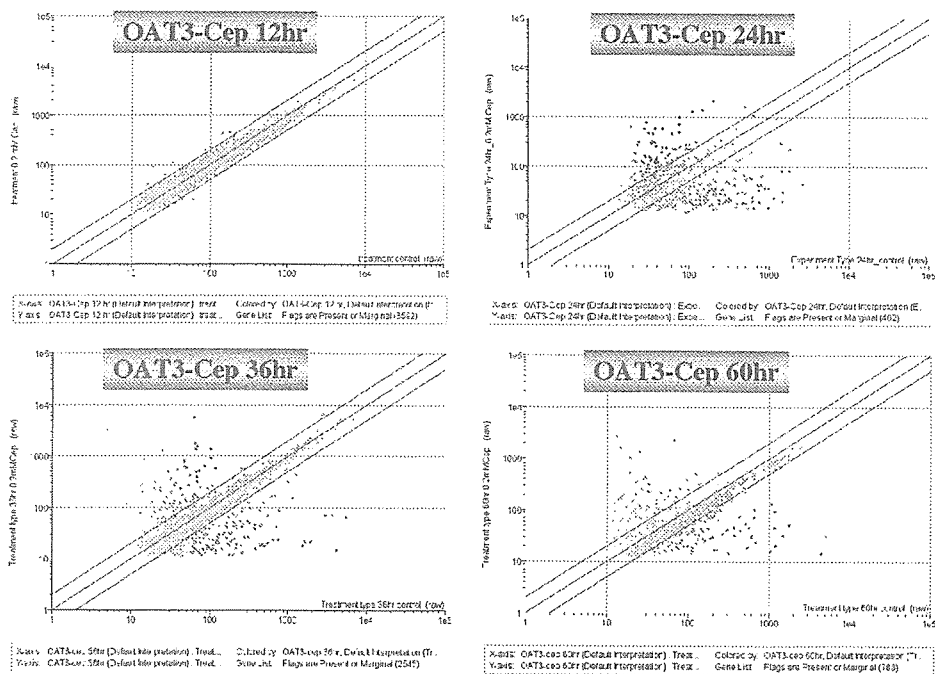


図5. セファロリジンのトランスポーター介在毒性のマイクロアレイ解析結果のプロファイリング。0.2mM セファロリジンによる有機アニオントランスポーターOAT3安定発現の各処理時間における遺伝子発現変動。

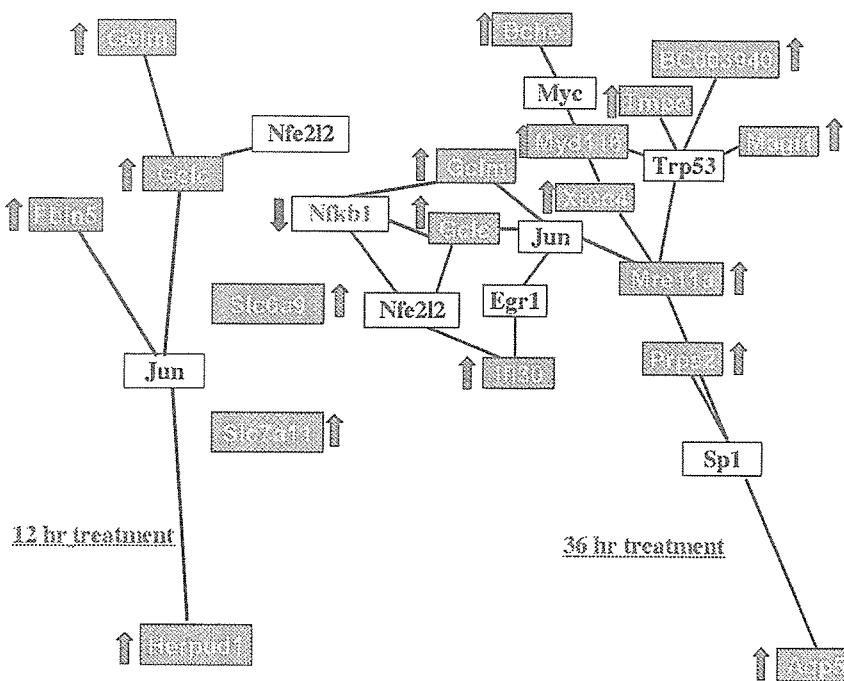


図6. セファロリジンにより発現変動が観察された遺伝子群のパスウェイ解析。

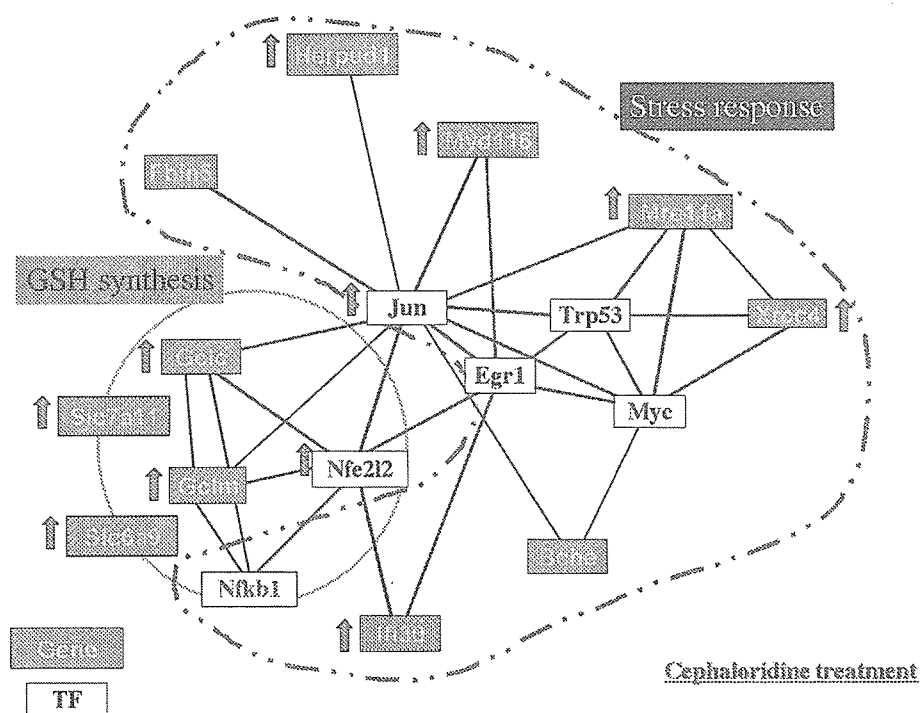


図7. セファロリジンにより発現変動が観察された遺伝子群のパスウェイ解析 (まとめ)。

Genes involve GSH synthesis

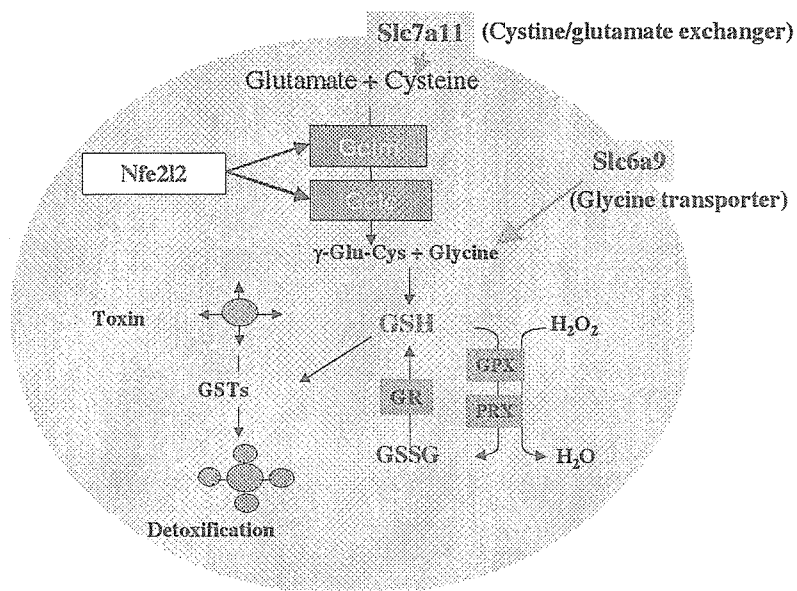


図8. セファロリジンにより発現上昇する遺伝子にはグルタチオン (GSH) 生成に関与する遺伝子群が含まれる。

RT-PCR of cephaloridine-affected gene expression

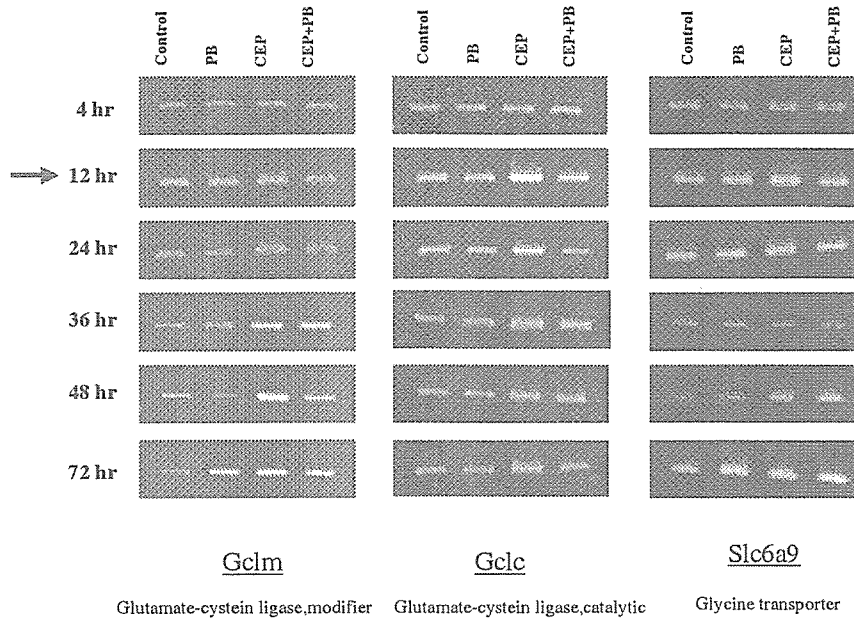


図 9. 発現変動が観察された遺伝子のPCRによる半定量解析による確認 (1)。

RT-PCR of cephaloridine-affected gene expression (cont.)

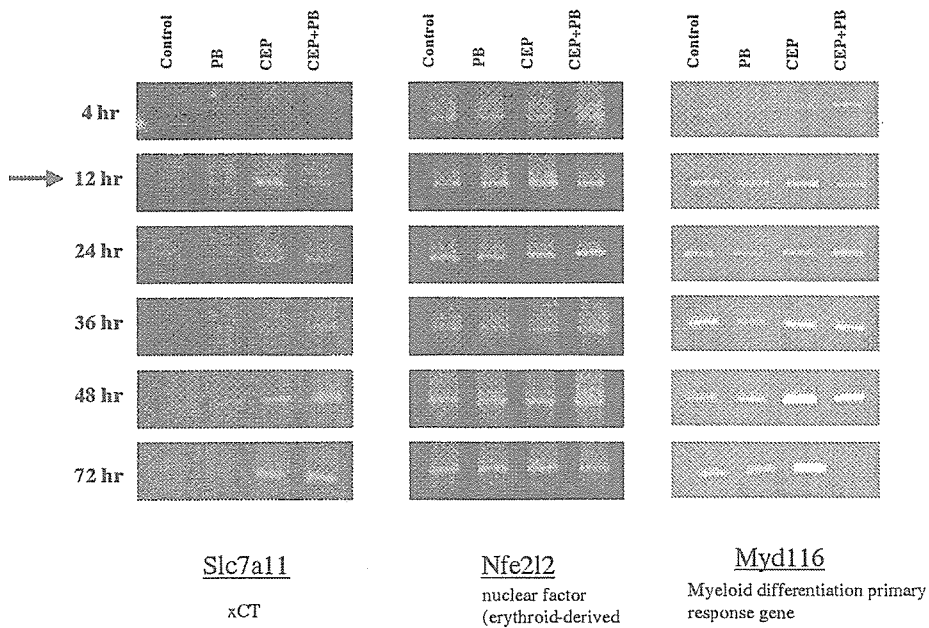


図 10. 発現変動が観察された遺伝子のPCRによる半定量解析による確認 (2)。

RT-PCR of cephaloridine-affected gene expression (cont.)

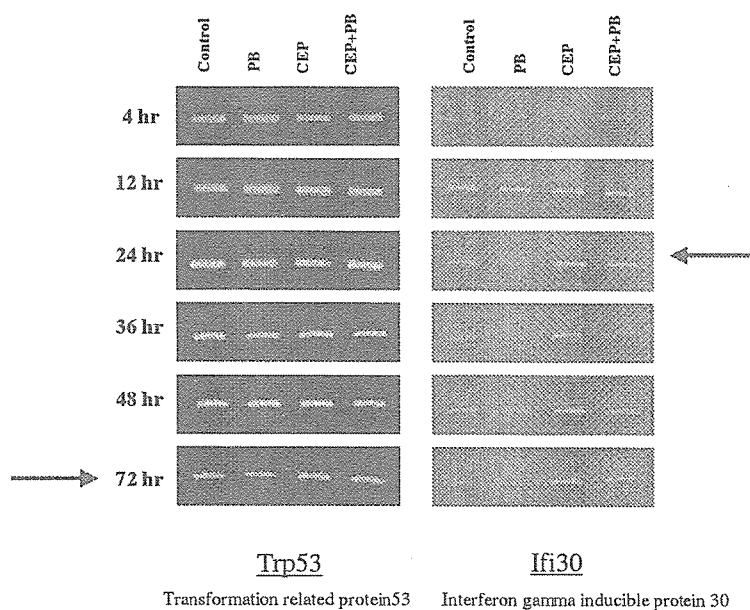


図 1 1. 発現変動が観察された遺伝子のPCRによる半定量解析による確認 (3)。

Gene expression level in S2-OAT3 during 4 hr treatment (mean \pm SD). The data were normalized with GAPDH.

	Gclc	Gclm	Slc6a9	Slc7a11	Nfe2l2
control	1.00 \pm 0.29	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.09
0.2 mM Cephaloridine	0.89 \pm 0.23	1.05 \pm 0.09	1.43 \pm 0.33	1.65 \pm 0.05***	1.59 \pm 0.96
0.2 mM Cephaloridine+ 0.1 mM probenecid	0.48 \pm 0.12*	0.74 \pm 0.03*	1.17 \pm 0.20	1.24 \pm 0.12*	1.01 \pm 0.29
0.1 mM probenecid	0.38 \pm 0.10*	0.73 \pm 0.03*	0.46 \pm 0.04***	0.51 \pm 0.04***	1.03 \pm 0.13

Note: results from qRT-PCR, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs control.

図 1 2. Gclc、Gclm、Slc6a9、Slc7a11、Nfe2l2に関する定量PCR (TaqMan PCR) による解析 (4 時間処時の解析結果)。

Gene expression level in S2-OAT3 during 12 hr treatment (mean \pm SD). The data were normalized with GAPDH.

	Gclc	Gclm	Slc6a9	Slc7a11	Nfe2l2
control	1.00 \pm 0.38	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.25	1.00 \pm 0.24	1.00 \pm 0.30
0.2 mM Cephaloridine	6.09 \pm 1.20***	3.14 \pm 0.41***	2.24 \pm 0.09***	14.77 \pm 2.88***	1.86 \pm 0.13**
0.2 mM Cephaloridine+ 0.1 mM probenecid	0.97 \pm 0.03	1.48 \pm 0.16**	1.25 \pm 0.36	3.98 \pm 0.69**	1.32 \pm 0.31
0.1 mM probenecid	0.61 \pm 0.29	0.92 \pm 0.19	1.58 \pm 0.24*	1.23 \pm 0.25	1.07 \pm 0.49

Note: results from qRT-PCR, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs control.

図 1 3. Gclc、Gclm、Slc6a9、Slc7a11、Nfe2l2に関する定量PCR (TaqMan PCR) による解析 (12時間処時の解析結果)。

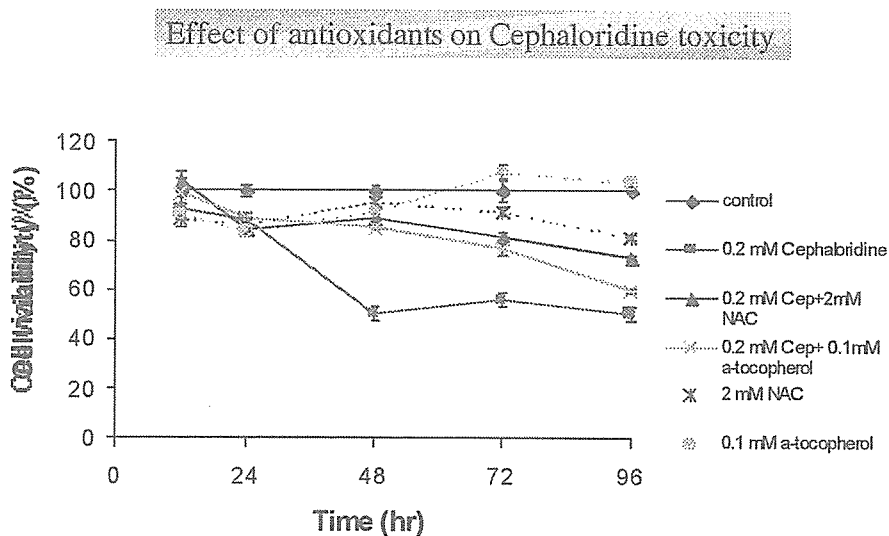


図 1 4. セファロリジン細胞毒性に対する抗酸化物質の効果。

S2-OAT3

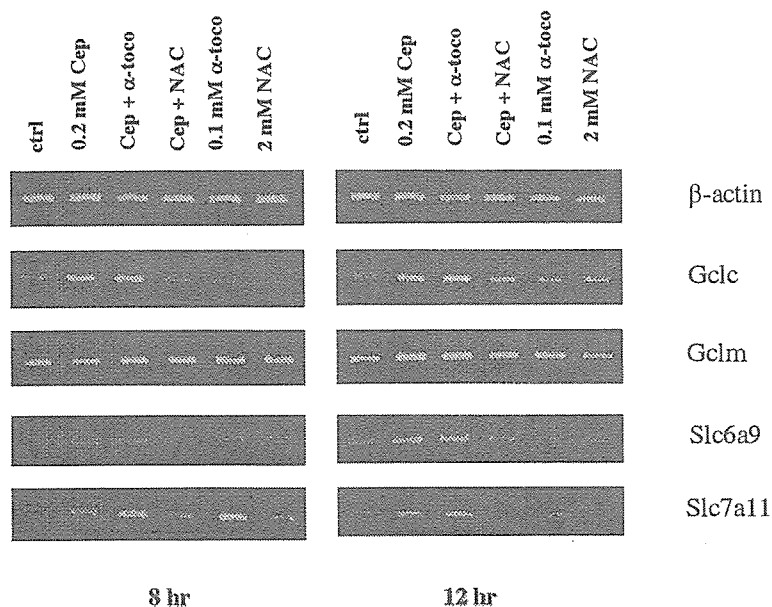


図 15. セファロリジンによる遺伝子発現変動に対する抗酸化物質の効果の半定量PCRによる解析 (1)。

S2-OAT3

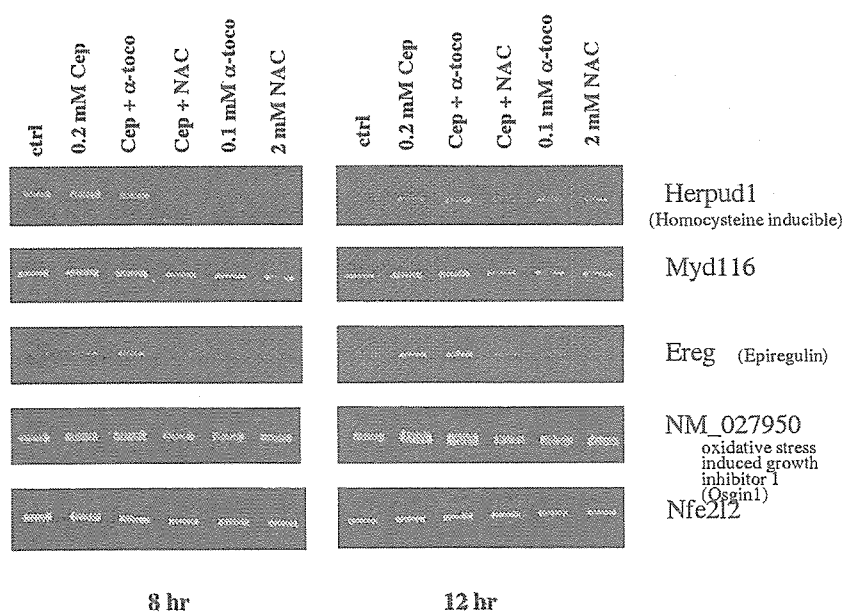


図 16. セファロリジンによる遺伝子発現変動に対する抗酸化物質の効果の半定量PCRによる解析 (2)。

Gene expression level in S2-OAT3 during 12 hr treatment (mean \pm SD). The data were normalized with GAPDH.

	Gclc	Gclm	Slc6a9	Slc7a11	Nfe2l2
control	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.03
0.2 mM Cephaloridine	6.01 \pm 0.49***	3.01 \pm 0.61**	4.83 \pm 0.48***	10.96 \pm 0.77***	1.18 \pm 0.19
0.2 mM Cephaloridine+ 0.1 mM α -tocopherol	4.37 \pm 0.58***	2.23 \pm 0.40**	2.16 \pm 0.34**	6.60 \pm 1.07***	0.78 \pm 0.04**
0.2 mM Cephaloridine+ 2 mM N-acetylcysteine	1.37 \pm 0.01**	0.76 \pm 0.01**	1.26 \pm 0.07**	0.94 \pm 0.07	0.66 \pm 0.03***
0.1 mM α -tocopherol	1.17 \pm 0.10	0.72 \pm 0.11*	0.95 \pm 0.03	0.61 \pm 0.11**	0.47 \pm 0.09***
2 mM N-acetylcysteine	1.30 \pm 0.05	0.69 \pm 0.07**	1.29 \pm 0.07**	0.89 \pm 0.11	0.94 \pm 0.28

Note: results from qRT-PCR, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs control.

図 17. セファロリジンによる遺伝子発現変動に対する抗酸化物質の効果の定量PCR (TaqMan PCR) による解析。

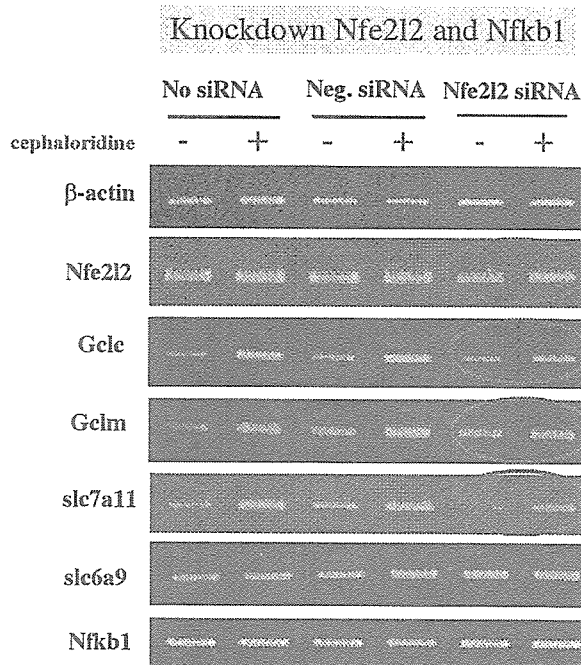


図 18. Nfe2l2ノックダウンのセファロリジン作用に対する影響 (1)。siRNAによるNfe2l2ノックダウン後、S2-OAT3細胞をセファロリジンで処理し、セファロリジンによる遺伝子発現変動を、siRNA未処理のもの (No siRNA)、対照siRNAで処理したもの (Neg. siRNA) と比較した。

Gene expression level in S2-OAT3 during 12 hr treatment after 1 day siRNA knockdown (mean \pm SD). The data were normalized with GAPDH.

	Gele	Gelm	Slc6a9	Slc7a11	Nfe2l2
control	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.28	1.00 \pm 0.16
0.2 mM Cephaloridine	2.18 \pm 0.19	2.12 \pm 0.17	1.64 \pm 0.12	3.46 \pm 0.28	1.00 \pm 0.32
Nfe2l2 siRNA	1.56 \pm 0.46	0.94 \pm 0.19	1.05 \pm 0.33	0.72 \pm 0.12	0.52 \pm 0.05
0.2mM cephaloridine + Nfe2l2 siRNA	1.19 \pm 0.13	1.14 \pm 0.01	1.25 \pm 0.21	0.74 \pm 0.23	0.85 \pm 0.17

図 19. Nfe2l2ノックダウンのセファロリジン作用に対する影響 (2)。siRNAによるNfe2l2ノックダウン後、S2-OAT3細胞をセファロリジンで処理し、セファロリジンによる遺伝子発現変動を、siRNA未処理のもの (control) と比較した。

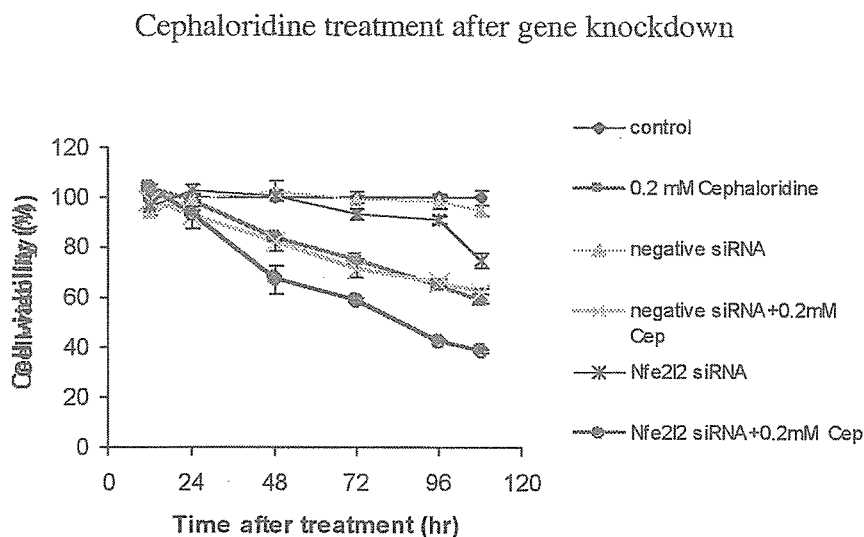


図 20. Nfe2l2ノックダウンのセファロリジン作用に対する影響 (3)。siRNAによるNfe2l2ノックダウン後、S2-OAT3細胞をセファロリジンで処理し、セファロリジンによる細胞障害性に対する効果を、siRNA未処理のもの (control)、対照siRNAで処理したもの (Negative siRNA) と比較した。

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）

分担研究報告書

大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究

分担研究者 中釜 齊 国立がんセンター研究所・生化学部長

研究要旨 遺伝子発現のクラスター解析の結果、長期連続投与で大腸発がん性が検出されない Trp-P-2 は、発がん性を有する HCA 類と同一のクラスターを形成した。Trp-P-2 を 400 ppm で F344 ラットに投与すると、32 週めで異型腺管の誘発性を示したが、high grade dysplastic ACF は検出されず、大腸がんの発生も認められなかった。Trp-P-2 と他の大腸発がん性 HCA との発がん性の違いの原因を調べるために、網羅的遺伝子発現解析の結果を、gene set enrichment analysis (GSEA) を用いてさらに詳細に検討した。MeIQx, MeIQ 双方において Trp-P-2 と比べて多く発現している遺伝子群が検出され、炎症に関与する遺伝子群も含まれていた。炎症やストレスに関与する遺伝子群が、HCA 類の大腸発がん性に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

加熱調理した肉や魚に含まれるヘテロサイクリックアミン (HCA) 類を始めとして、環境中に存在する種々の変異原・がん原性物質はヒトのがんの原因物質である可能性が考えられる。しかしながら、その詳細については未だ不明な点が多い。又、これら化合物による傷害に対する個体の感受性あるいは抵抗性を規定している遺伝的な要因の本態も殆ど解明されていない。本研究は、環境中の種々の変異原・がん原性物質により誘発される動物の発がんモデルを用いて、① 化合物特異的な遺伝子発現と遺伝子発現プロファイ

ルの経時的変化、及び② その用量相関性、③ 発がん感受性の異なる動物系統における発現プロファイルの差異について GeneChip (Affymetrix) を用いた包括的解析を行い、各化合物に特徴的な遺伝子発現プロファイルや遺伝子変異に関するデータを集積する。これにより、発がんに重要な遺伝子変化の解明、既知化合物の低用量曝露による発がん性の予測、化合物曝露後の早期段階での遺伝的指標による発がん性予測が可能となる。さらに、遺伝情報に基づいたヒトの発がんリスク評価や、発がん感受性を規定する遺伝的要因の解明による発がん高危険度群の掌

握が可能となる。

B. 研究方法

(1) Trp-P-2 及び MeA α C の「短期間歇投与法」による長期発がん実験

大腸発がん性 HCA としては、PhIP, MeIQ, IQ, Glu-P-1, MeIQx を、非大腸発がん性 HCA としては、Trp-P-2, A α C, MeA α C を各々 400, 300, 300, 500, 400, 100, 500, 200 ppm の飼料中濃度で、「短期投与法」

(HCA 含有基礎食を 2 週間、高脂肪食を 4 週間) によりラットに投与した。大腸粘膜より抽出した RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、非大腸発がん物質に分類された Trp-P-2 は、大腸発がん性を有する HCA と同一のクラスターを形成し、大腸発がん物質である可能性が示唆された。Trp-P-2 の飼料中濃度を 400 ppm に増量し、「短期投与法」を 3 回繰り返した後、高脂肪食のみを投与する「短期間歇投与法」で長期発がん実験を行った。投与開始後 6 週で 4 匹の、18、32 週において各 10 匹のラットの大腸標本を採取し、大腸病変の有無を検討した。また、MeA α C は、「短期投与法」において ACF 誘発性が 1 個体当たり 0.4 \pm 0.6 個とわずかであるが誘発されたので、飼料中濃度を 400 ppm に増量して同様の実験を行った。大腸前がん病変である dysplastic ACF を簡便かつ効率よく検出できる分別染色法で観察し、ACF、ACF-D (ACF detected by differential staining; 大腸がんの前がん病変である dysplastic ACF と良く一致する分別染色法で検出される ACF) 及び腫瘍の誘発について経時的に観察した。

(2) 種々の HCA の「短期投与法」により発現変動する遺伝子群の Gene set enrichment 解析 (GSEA)

Trp-P-2 と他の大腸発がん性 HCA との発がん性の違いの原因を調べるために、網羅的遺伝子発現解析の結果を、gene set enrichment 解析 (GSEA)¹⁾ を用いてさらに詳細に検討した。遺伝子の機能から、各遺伝子を遺伝子群に分類した Functional set (C2)¹⁾ をラットの遺伝子発現解析データで使用可能なように、XCollapseProbes¹⁾ で改変し、GSEA で解析を行った。それぞれ、Trp-P-2 投与群と大腸発がん性 HCA 投与群、ACF 誘発性を示す MeA α C と示さない A α C 投与群、HCA 非投与群と HCA 投与群間の比較を行った。

1) Subramanian et al., PNAS, 102: 15545-15550, 2005

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については所属施設である国立がんセンターの実験動物倫理委員会の承認を受け、動物実験に関する規約を遵守し、実験に供する動物数も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いる。動物の苦痛に対する配慮も十分に払う。

C. 研究結果

(1) Trp-P-2 及び MeA α C の「短期間歇投与法」による長期発がん実験

Trp-P-2 は、飼料中濃度 100 ppm では ACF 誘発性を示さない。しかしながら、網羅的遺伝子発現解析のクラスター解析により、発がん性 HCA である MeIQ, MeIQx, Glu-P-1 と同じクラスターに属したことから、大腸発

がん物質である可能性が示唆された。Trp-P-2の飼料中濃度を400ppmに増量し、「短期間歇投与方法」を適応することにより、Trp-P-2が大腸発がん性を示すかどうかを経時的に観察した。投与開始後、6, 18, 32週では、ACF誘発性は各々1個体当たり2.0 ± 1.2, 1.9 ± 2.3, 3.1 ± 2.2であった。ACF-Dの誘発性は、投与開始後、6, 18, 32週では1.5 ± 1.3, 1.8 ± 1.8, 2.6 ± 1.8であった。PhIP, MeIQ, IQを「短期間歇投与方法」で投与した場合の32週時のACF-Dは1個体当たり3.2 ± 2.6, 3.1 ± 2.2, 2.0 ± 1.6であり、Trp-P-2は、PhIP, MeIQ, IQと同程度の個数のACF-Dを誘発した。Trp-P-2で誘発されたACF-Dの組織学的解析の結果、high grade of dysplastic ACFはなく、また、大腸がんの発生も認められなかった。

MeA α C投与群では、投与開始後、6, 18, 32週では、ACF誘発性は各々1個体当たり2.8 ± 1.5, 4.7 ± 2.3, 2.2 ± 1.8であった。ACF-Dの誘発性は、投与開始後、6, 18, 32週では1.3 ± 1.5, 2.1 ± 1.9, 1.9 ± 1.9であった。これらのACF-Dに関しては現在、組織学的解析を行っている。

(2) 種々のHCAの「短期投与方法」により発現変動する遺伝子群のGene set enrichment 解析(GSEA)

Trp-P-2は、網羅的遺伝子発現解析のクラスター解析の結果、大腸発がん性HCAと同一のクラスターに属したにもかかわらず、発がん性を示さなかった。この発がん性の違いの原因を調べるために、網羅的遺伝子発現解析の結果を、gene set enrichment analysis (GSEA)を用いてさらに詳細に検討した。MeIQx, MeIQ双方においてTrp-P-2

と比べて多く発現している遺伝子群が4個検出され、それはsppaPathway, erkPathway, RAP DAWN, Inflammatory Response Pathwayであり、炎症に関与する遺伝子群が含まれていた。

MeA α CはA α Cと同じクラスターに属し、MeA α CはACF誘発性を示すが(飼料中濃度400ppm)、A α Cは示さなかった。GSEAの結果、MeA α Cは炎症に関連する遺伝子群(ST Interleukin 4 Pathway)がA α Cよりも多く発現していた。

炎症やストレスに関与する遺伝子群が、HCA類の大腸発がん性に寄与している可能性が示唆された。

D. 考察

(1) Trp-P-2は、飼料中濃度100ppmでの「短期投与方法」により、ACF誘発性を示さなかったが、大腸粘膜から抽出したRNAによる網羅的遺伝子発現解析のクラスター解析の結果、大腸発がん性HCAであるMeIQ, MeIQx, Glu-P-1と同一のクラスターを形成し大腸発がん物質である可能性が示唆された。飼料中濃度を400ppmに増量して「短期間歇投与方法」により検討した結果、dysplastic ACFは誘発されるが、high grade dysplastic ACFや大腸がんは誘発されなかった。投与期間6週間の「短期投与方法」での網羅的遺伝子発現解析のクラスター解析では、dysplastic ACFの誘発性までは推測可能であるかもしれないが、さらに大腸腫瘍の誘発性を推測するには、別のファクターが必要であることが示唆された。また、MeA α Cは、「短期投与方法」でのACF誘発